食虫植物の「記憶」現象に関する生物有機化学

Bioorganic chemical study on "memory" phenomenon in the trap movement of the Venus flytrap

代表研究者　東北大学　上田　実　　Tohoku University　Minoru UEDA
協同研究者　東北大学　魚住　信之　　Tohoku University　Nobuyuki UOZUMI
　　東北大学　岡田　正弘　　Tohoku University　Masahiro OKADA

The Venus flytrap (*Dionaeamuscipula*) is an insectivorous plant that rapidly captures insects using insect catching leaves. Rapid closure of the leaves requires two stimuli on the sensory hairs, and it never occurs by only a single stimulus. In other words, the Venus flytrap "remembers" the first stimulus. We have hypothesized that the stepwise accumulation of the chemical compound to be secreted by each stimulus would initiate "memory" process to trap insects. Using genetically uniform clones of Venus flytrap for bioassays, we purified endogenous leaf-closing factorof Venus flytraps without external stimuli. Recently, we identifiedthe jasmonateglucoside as a potential bioactive metabolite from the extract of *D. muscipula*. Potassium salt of the compoundshowed leaf-closing activity at 3 μM,approximately 100-fold greater than free form of one. However, further confirmation will be inevitable, that is, a confirmation on the generation of active potential by jasmonateglucoside.

研究目的

食虫植物ハエトリソウは、特異な２枚の捕虫葉で昆虫を挟むように捕らえ、消化する最も有名な食虫植物である。ハエトリソウの捕虫運動は、捕虫葉の中の「感覚毛」に 30 秒以内に 2 回触れることで起こる。これは、植物における「記憶」とも言うべき現象である。1873 年には、ロンドン大の Burdon-Sanderson らによって、ハエトリソウの運動に伴って活動電位が発生する事が報告されているが、その後 130 年、活動電位の発生と「記憶」現象に関する検討は行われなかった。本申請では、ハエトリソウの運動を引き起こす内生生理活性物質を単離するとともに、これをツールとして用いる生物有機化学的研究によって、食虫植物の「記憶」機構の解明を目指す。

研究経過

ハエトリソウの閉葉運動を引き起こす低分子生理活性物質の探索を行い、各種クロマトグラフィーを用いて精製を行った結果、最先端の活性画分の主成分がジャスモン酸配糖体であることを明らかにした。しかしながら、精製した活性物質の単離量が 80 マイクログラムと微量であったことから、

LC/MS を用いたイオンクロマトグラムにより、合成試料との保持時間の比較を行った。その結果、活性物質と合成した配糖体型ジャスモン酸サンプルとの保持時間は完全に一致した。さらに、精製した天然物、合成サンプルともに、7 位立体異性体の 96:4 の混合物であった。

続いて、合成サンプルの活性値を調べ、天然物との比較を行うことにした。30 枚のハエトリソウ補虫葉のうち 10 枚以上の葉が閉葉活性を示した場合に活性があると判断し、合成サンプルの活性値を調べた。その結果、合成試料は、300μM の濃度で閉葉活性を示し、単離した天然物の活性強度である 0.1 g/L とほぼ同等であった (Figure 1A)。従って 精製した活性画分中に含まれるジャスモン酸配糖体が葉を閉じさせる活性の本体であると結論した。

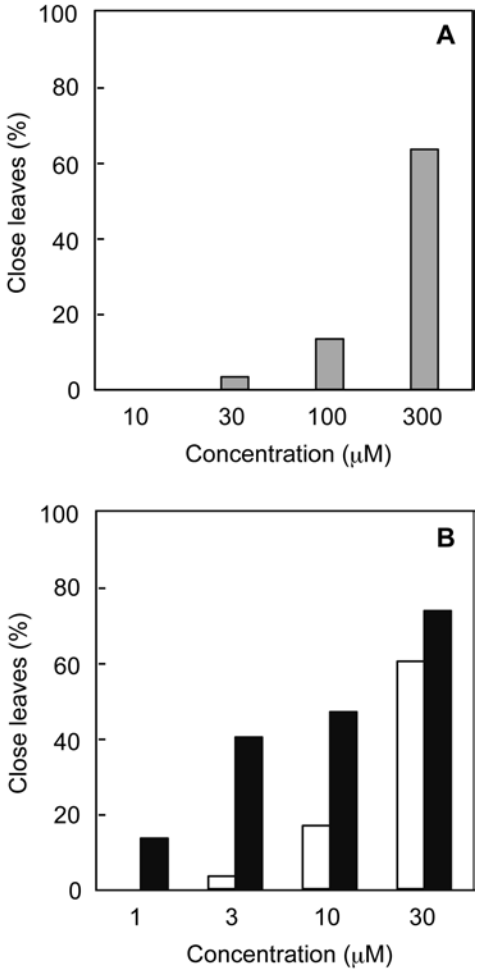

Figure 1. Effects of various forms of jasmonateglucoside on trap-leaves closure of *Dionaeamuscipula*.

(A) The percentages of close leaves for 30 leaves treated with free form of jasmonateglucoside (gray bars).

(B) The percentages of close leaves for 30 leaves treated with potassium salt of jasmonateglucoside (black bars) and sodium salt of jasmonateglucoside (white bars).

以上のようにして、ハエトリソウの閉葉運動を引き起こす低分子物質として、ジャスモン酸配糖体を得た。しかしながら、各精製過程における活性の回収率が低く、これは特に最終段階においては顕著であった。そこで、この原因を解明するために、NMR スペクトルでは解析を行うことが困難

な無機成分に着目し、金属カチオン量を測定することにした。キャピラリー電気泳動装置を用いて、各精製段階における金属カチオンの一斉分析を行った結果、精製効率の悪い段階においては金属カチオン含有量が大幅に減少するという結果が得られ、ハエトリソウの閉葉活性が金属カチオンに大きく依存するということが示唆された。そこで、実際に活性物質のカウンターカチオンの種類による活性の変化を調べることにした。合成サンプルを遊離カルボン酸型（-COOH）として再精製した後に、各種アルカリ塩で中和することでカウンターカチオンを置換し、それぞれの活性を調べた。なお、各金属塩の純度についてはキャピラリー電気泳動装置を用いて>90%の純度であることを確認した。前述と同様に 30 枚のハエトリソウ補虫葉のうち 10 枚以上の葉が閉葉活性を示した場合に活性があると判断し、カウンターカチオンによる合成サンプルの活性値の変化を調べた。その結果、遊離酸の場合は前述のように、300μM の濃度で閉葉活性を示したのに対し、ナトリウム塩の場合は約 10 倍の活性強度である 30μM の濃度で閉葉活性を示した。さらに、カリウム塩の場合は約 100 倍の活性強度である 3μM の濃度で閉葉活性を示し、カウンターカチオンの種類によってハエトリソウの閉葉活性が大きく変化した (Figure 1B)。

また、ジャスモン酸配糖体は、２つの立体異性体の 96:4 の割合の混合物であるため、活性本体がどちらの異性体であるかを調べた。まず、生物検定試験が可能かどうかを調べるため、室温での安定性を調べた。両異性体は、室温、水溶液中では平衡状態で存在している。両者の半減期は約 10 日であり、生物検定試験の間に非酵素的な異性化は起こらないと判断した。そこで HPLC を用いた両異性体の精製条件の検討を行った。逆相の ODS カラムを使用し、アセトニトリルと酢酸アンモニウム水溶液を移動相に用いた条件で HPLC 分離精製を行い、得られた両異性体の精製溶液をカラム精製することで、大過剰に含まれる酢酸アンモニウムの脱塩を行い、カリウム塩を調製することで主異性体を 99.9%以上の純度で、副異性体を 92%以上の純度で得た。これらを用いて生物検定試験を行ったところ、両立体異性体とも 3μM の濃度で閉葉活性を示し、立体化学の違いによる閉葉活性の変化は観測されず、どちらの異性体が活性本体であるかを示すことはできなかった。

考察

今回我々は、配糖体型ジャスモン酸が、ハエトリソウの閉葉運動を引き起こす低分子内生生理活性物質であることを証明した。一方で、以前に我々は、３種類の糖を構成成分とする多糖もハエトリソウの閉葉運動を引き起こす高分子内生生理活性物質であることを明らかにしており、両物質のどちらが活性本体であるか、あるいはどのような相互作用を行ってハエトリソウの閉葉運動を引き起こしているかは全く不明である。活性本体の同定には、葉の運動をモニターするだけでなく、運動を惹起する直接的なメカニズムとして知られている活動電位の発生をモニターする必要がある。これは、現在の導管経由で活性物質を導入する方法では難しく、植物体に活性物質を素早く導入し、直後からの電位変化をモニターできる実験系の構築が必要である。生物現象をコントロールする物質の探索には、生物個体の応答と、メカニズムに直結する機構の２つをダブルスタンダードとするアッセイ系の利用が望ましいと考えられる。

研究発表

口頭発表

1.　上田　実、「エナンチオ・ディファレンシャル法による植物の運動の生物有機化学」、特定領域研究「生体機能分子の創製」とりまとめシンポジウム（東京）、2008 年 6 月。

2.　上田　実、「化学が解き明かす植物の眠りのしくみ」、第 6 回化学イノベーションシンポジウム：明日をひらく化学のとびら（仙台）、2008 年 8 月。

3.　Minoru Ueda, The 20th Naito Conference on Chemical Biology, Hokkaido, Japan (September, 2008).

4.　Minoru Ueda, "Recent advances on chemical biology of plant nyctinasty",2008 RIKEN Conference on Chemical Biology, Narita, Japan (November, 2008).

5.　上田　実、「植物就眠運動を制御するグリコシド型生物活性分子の化学」、日本生物工学会北日本支部仙台シンポジウム　グライコバイオテクノロジー―糖と酵素が織りなすサイエンスとバイオテクノロジーの魅力と可能性―、2009 年 8 月。

6.　上田　実、「ジャスミン香気成分誘導体と植物の就眠運動」、第 10 回アロマ・サイエンス・フォーラム 2009（東京）、2009 年 10 月。

7.　Minoru Ueda, Chem-Bio Informatics Society 2009 on Chemical Biology, Seoul, Korea (November,2009).

誌上発表

1.　上田実、中村葉子、岡田正弘、植物の就眠運動と食虫植物の”記憶”現象の生物有機化学、植物の生長調節、42、61-71 (2008).

2.　上田　実、中村葉子、真鍋良幸、植物生理活性物質のケミカルジェネティックス、細胞工学、28、354-359 (2009).